

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007573416

WPI Acc No: 1988-207348/198830

XRAM Acc No: C88-092551

**New DNA fragment contg. gene for resistance to lincosamide(s) - useful as probe, resistance marker in cloning vector and for expressing polypeptide**

Patent Assignee: INST PASTEUR (INSP )

Inventor: COURVALIN P; LECLERCQ R; VBRISSENOE A

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
FR 2607827	A	19880610	FR 8616939	A	19861203	198830 B

Priority Applications (No Type Date): FR 8616939 A 19861203; FR 8514397 A 19850927

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
FR 2607827	A	25		

Abstract (Basic): FR 2607827 A

Probe (I) is claimed, used to detect resistance to lincosamides in bacteria and is characterised by comprising at least part of the LinA' gene of formula (I).

Also new is the DNA Fragment which includes the sequence for expression of the LinA' gene.

USE - The fragment is used as a resistance marker for cloning vectors and polypeptide expressed by the gene can be used to inactivate Lincosamides, imparting resistance to lincomycin.

0/2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE**  
**INSTITUT NATIONAL**  
**DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**  
**PARIS**

**11** N° de publication : **2 607 827**  
à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction

**(21) N° d'enregistrement national : 86 16939**

⑤1 Int Cl<sup>4</sup> : C 12 N 15/00; C 12 Q 1/68, 1/04; C 12 P 19/34, 21/02; C 07 H 21/04 // C 07 H 15/16; (C 12 N 15/00).

**⑫ DEMANDE DE CERTIFICAT D'ADDITION  
À UN BREVET D'INVENTION**

## A2

②② Date de dépôt : 3 décembre 1986.

**(30) Priorité :**

**(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 23 du 10 juin 1988.**

**(60) Références à d'autres documents nationaux appa-**  
**rentés : 1<sup>re</sup> additio**n au brevet 85 14397 pris le 27  
septembre 1985.

⑦1 Demandeur(s) : *INSTITUT PASTEUR, établissement public.* — FR.

**(72) Inventeur(s) : Anne Brisson-Noël ; Roland Leclercq ; Patrice Courvalin.**

⑦③ Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : S.C. Ernest Gutmann et Yves Plasse-  
raud.

**(54) Fragment d'ADN comprenant au moins une partie d'un gène de résistance aux lincosamides et applications biochimiques et biologiques.**

**57** Le fragment de nucléotide de l'invention comprend au moins une partie du gène *linA'*, ce gène codant pour un polypeptide capable d'inactiver les lincosamides et de conférer des propriétés de résistance à la lincomycine, et étant inclus dans la séquence représentée sur la figure 2.

Date		Time		Location		Weather		Wind		Sea		Visibility		Temperature		Humidity		Pressure		Remarks	
Day	Month	Year	Hour	Minute	Place	Condition	Direction	Force	Height	Direction	Force	Distance	Air	Sea	Relative	Barometer	Wet Bulb	Dew Point	Notes		
1	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
2	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
3	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
4	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
5	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
6	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
7	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
8	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
9	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
10	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
11	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
12	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
13	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
14	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
15	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
16	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
17	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
18	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
19	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
20	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
21	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
22	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
23	Jan	1950	08	00	San Francisco	Partly Cloudy	W	10	10	W	10	10	10								

**FR 2 607 827 - A2**

FRAGMENT D'ADN COMPRENANT AU MOINS UNE PARTIE D'UN GENE  
DE RESISTANCE AUX LINCOSAMIDES ET APPLICATIONS BIOCHI-  
MIQUES ET BIOLOGIQUES -

-----

5 L'invention est relative à un fragment d'ADN  
comprenant au moins une partie d'un gène de résistance  
aux lincosamides et à ses applications biologiques et  
biochimiques.

10 Elle correspond à un développement de la  
demande de brevet principal n° 85/14397 du 27 Septembre  
1986, qui concerne notamment un fragment d'ADN interne au  
gène linA utilisable comme sonde de détection de  
résistance aux lincosamides dans des cultures cellulaires,  
notamment bactériennes.

15 Des expériences d'hybridation ADN-ADN à l'aide  
d'une sonde constituée d'un fragment Sau3A interne au  
gène linA ont permis d'étudier la distribution de ce gène  
chez des souches de staphylocoques pathogènes résistant  
aux lincosamides par inactivation. Les inventeurs ont pu  
20 ainsi établir que la souche de Staphylococcus aureus  
BM4611, qui n'hybride pas avec la sonde linA, contient un  
gène différent codant également pour l'inactivation de la  
lincomycine et de la clindamycine.

25 L'invention a donc pour but de fournir un  
nouveau fragment d'ADN comportant au moins une partie de  
la séquence d'un gène conférant des propriétés de  
résistance aux lincosamides à une bactérie.

30 Elle vise également à fournir un procédé  
d'obtention de ce fragment d'ADN par clonage dans une  
bactérie.

35 L'invention vise, en outre, les applications  
biologiques et biochimiques de ce nouveau fragment d'ADN,  
en particulier pour l'élaboration de sondes pour la  
détection de bactéries résistant aux lincosamides et pour  
la construction de vecteurs de clonage pour l'étude

2

d'autres systèmes biologiques.

L'invention vise également à fournir la protéine correspondant à la séquence nucléotidique du fragment considéré et les anticorps, plus spécialement les anticorps monoclonaux, capables de reconnaître spécifiquement cette protéine.

Le fragment d'ADN de l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend au moins une partie du gène linA' codant pour une protéine capable d'inactiver les lincosamides, et étant inclus dans la séquence nucléotidique suivante :

		ATG AAA ATT GAT AAT GTA	662
15			
	ACA GAA AAG GAT TTA TTT TAT ATT TTA GAC TTA TTT GAA AAA ATG GAA GTA ACT CAT TGG	722	
	TTA GAT GGA GGC TGG GGC GTA GAT GTA TTA ACT GGA AAA CAA CAA AGA GAA CAC AGA GAT	782	
	ATA GAT ATA BAT TTT GAC GCT CAA CAC ACT CAA AAA GTT ATA AAA AAA TTA GAA GAT ATA	842	
20	GGA TAC AAA ATA GAA GTT GAT TGG ATG CCT TCA CGT ATG GAA CTT AAA CAT AAA GAA TAT	902	
	GGA TAT TTA GAT ATT CAT CCT ATA AAT TTA AAT GAT BAT GGT TCC ATT ACT CAA GCA AAC	962	
	CCA GAA GGT GGC AAT TAC ATC TTT CAA AAT GAA TGG TTT TCA GAA ACT AAT TAT AAA GGT	1022	
25	LGA AAA ATA CCA TGC ATT TCC AAA GAA GCT CAA CTT CTT TTT CAT TCC GGT TAT GAA TTA	1082	
	ACA GAA AAA GAC CAT TTT GAT ATA AAA AAT TTA AAA TCA ATA ACT		

30

35

La séquence nécessaire pour l'expression de ce gène linA correspond à la séquence suivante :

```

5          AAGCTTTAGA CATATGCTTT AAGCTCTCTT CTAAATGTTG      40
ACCGTCTATT GCATTTC TAG TCSACAAAGT TAGGAATAAC CAACGAGAAG TAGGTTTTTC TTAAACCACT      110
TCITCAATCA CTTTTGAGC TTGATAACTA TTTTCATAG CACSCCTCCA ATTACGACC GGACATAATT      180
TAGATTTACA AAACCATGTC TTATGTAAC TCAAATATCC TTCATCAGTC GGCTTGAACT CTAGGACSTT      250
TCCACATTTGT TTTACSTTAT AAGCCTTTTT TATTTTAGT ATTCAAGTA TATCTGCATA GCTACATTA      320
10 TCTATTTCT TCTCTCCAT GGGCGTGTG CCACTTTTGT CATATCTTTA ATGTTTCGTT ATCTTGATTT      390
TCTCTATAT ATTTTGTATG ATTCTTTGC ATATAAAAG ACCTGCCAGT ATTAAGTTGA TGASTAGATG      460
TTTCAATCTT GATTACTGGA GTTTTTTATG TCAAATTTTC CTTTCAESCA TAAAAATACA TAAAAACACT      530
AGTCATATCA CBTAAATATG ATGTTTAATA TCTTTGAGTT ATTTCTATAT AGTATCAAGA CAASAGGARA      600

          RBS
15 CTCGTTTCA ACTCGTTTCA AATTCCTAAA TTAGGAGGGG TAAA      ATG AAA ATT SAT AAT GTA      662
ACA GAA AAG GAT TTA TTT TAT ATT TTA SAC TTA TTT GAA AAA ATG GAA GTA ACT CAT TGG      722
TTA GAT GGA GGC TGG GGC GTA GAT GTA TTA ACT GGA AAA CAA CAA AGA GAA CAC AGA GAT      782
ATA GAT ATA BAT TTT SAC GCT CAA CAC ACT CAA AAA GTT ATA AAA AAA TTA GAA GAT ATA      842
20 GGA TAC AAA ATA GAA GTT GAT TGG ATG CCT TCA CBT ATG GAA CTT AAA CAT AAA GAA TAT      902
GGA TAT TTA GAT ATT CAT CCT ATA AAT TTA AAT GAT GAT GGT TCC ATT ACT CAA GCA AAC      962
CCA GAA GGT GGC AAT TAC ATC TTT CAA AAT GAA TGG TTT TCA GAA ACT AAT TAT AAA GAT      1022
25 GGA AAA ATA CCA TGC ATT TCC AAA GAA GCT CAA CTT CTT TTT CAT TCC GGT TAT GAA TTA      1082
ACA GAA AAA GAC CAT TTT GAT ATA AAA AAT TTA AAA TCA ATA ACT TAA TT TCTTTATTC      1142
AATTGCTTTA TTCCATTTG TTTATTCOA TTGCTTTATT GACSTTSAGC CTCGAAACCC TTAACGATCC      1202
CAAAACTTGC CCAATGTCG GTTAATAGC TCACGCTATG CCSACATTCG TCTGCAAGTT TAGTTAAGGG      1262
30 TTGCTCTCAA CACACAATAA TTTCTCSEAT AATGCTGTGT TCTATTTTTT ATTTTACTC CTCCTGATAG      1322
CAAAAAACGC CATTCCAATA CAAAACCACA TACCTATAAT CSAT      1382

```



- 4 -

L'expression "au moins une partie du gène linA" désigne toute séquence nucléotidique correspondant à une partie de ce gène et présentant une longueur et une homologie suffisantes pour reconnaître spécifiquement ce gène dans un prélèvement à l'étude, dans des essais, d'hybridation mettant en jeu cette séquence en tant que sonde. Cette expression désigne également toute séquence nucléotidique hybridable avec la précédente, telle qu'obtenue par transcription enzymatique inverse de l'ARN correspondant ou encore par synthèse chimique.

Il va de soi que les bases de la séquence nucléotidique considérée peuvent être dans un ordre différent de celui trouvé dans les gènes et/ ou que ces bases peuvent être, le cas échéant, substituées, dès lors qu'une sonde élaborée à partir d'une telle séquence donne une réponse caractéristique et non équivoque quant à la capacité de reconnaître la présence du gène linA.

La séquence codante du gène linA est caractérisée en ce qu'elle est définie par le codon d'initiation ATG en position 645 et le codon de terminaison TAA en position 1127 dans une phase de lecture ouverte (ou PLO) de 483 paires de base.

La séquence du gène linA présente une homologie de 449 sur 483 pb, soit 93% avec le gène linA.

Les travaux des inventeurs ont montré que la séquence du gène linA est présente dans le plasmide naturel pIP856 de Staphylococcus aureus BM4611, de 2,6 kilobases, auquel il confère un niveau de résistance élevé à la lincomycine. Ce plasmide contient un site unique HindIII.

La sonde de S.aureus BM4611 a été déposée le 3 Décembre 1986 sous le n° I 634 à la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (C.N.C.M.).

Le gène linA est également caractérisé en ce qu'il est porté par un fragment d'ADN HindIII-ClaI de 1,4

L'expression de la séquence nucléotidique du déterminant de résistance aux lincosamides selon l'invention dans des minicellules d'E.coli conduit à la production d'une protéine ayant une masse moléculaire apparente  $M_r$  de l'ordre de 19000 à 21000 daltons, telle que déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide -SDS.

15                    La séquence correspondante de 161 acides aminés  
est la suivante :

35

- 6 -

L'invention vise également les plasmides et les phages recombinants contenant au moins une partie des fragments d'ADN ci-dessus recombinés avec des fragments hétérologues ainsi que les vecteurs recombinants, notamment les plasmides hybrides comportant au moins une partie du gène linA'. L'utilisation du fragment d'ADN permettant l'expression du gène linA' comme marqueur de résistance permet d'utiliser de tels vecteurs comme outils de clonage pour d'autres systèmes biologiques.

De nouveaux plasmides comprennent le plasmide pAT24 construit en clonant dans le plasmide pUC8 de 2,7kb digéré par les enzymes AccI et HindIII, les fragments obtenus par digestion par des enzymes de restriction appropriés de 2,6 kb du plasmide pAT23, ce plasmide recombinant résultant lui-même de la linéarisation du plasmide pIP856 par HindIII et de son clonage dans le site HindIII de pBR329.

L'invention vise, en outre, en tant qu'intermédiaire les souches bactériennes modifiées, ou transformants, caractérisées par l'insertion dans leur génome d'au moins une partie d'un fragment d'ADN tel que défini ci-dessus.

Conformément à l'invention, l'obtention de la séquence du gène linA' codant pour une protéine capable d'inactiver les lincosamides comprend :

- le clonage du déterminant de résistance aux lincosamides,
- la purification du fragment de 1,4kb, par digestion avec les enzymes de restriction appropriées d'un plasmide renfermant la séquence du gène linA', tel que pIP856, pAT23 ou pAT24,
- le sous-clonage de fragments de restriction dérivés de ce fragment de 1,4kb dans les formes répliquatives des phages M13mp10, mp18 et mp19.

35

- 7 -

Grâce à la détermination de la séquence du gène linA', les inventeurs ont disposé de moyens permettant d'étudier les possibilités de construction de sondes intragéniques dans le but, en particulier, d'effectuer  
5 une étude épidémiologique de la dissémination du gène linA' parmi un ou plusieurs genres bactériens.

L'invention vise donc des sondes pour la détection de la résistance aux lincosamides dans les bactéries élaborées à partir d'un fragment intragénique  
10 du gène linA' décrit ci-dessus.

Des sondes appropriées pour ce type de détection sont avantageusement marquées par un élément radioactif ou tout autre groupe permettant sa reconnaissance à l'état hybridé avec la préparation renfermant  
15 l'ADN à étudier.

Selon les techniques classiques, ces sondes sont mises en contact avec un échantillon biologique renfermant des bactéries, ou directement avec ces bactéries ou leurs acides nucléiques, dans des conditions  
20 autorisant l'hybridation éventuelle de la séquence nucléotidique de la sonde avec une séquence complémentaire, éventuellement contenue dans le produit testé.

La distribution du gène linA' a été étudiée par hybridation (ADN-ADN) chez des souches de staphylocoques.

Des résultats reproductibles ont été obtenus en utilisant comme sondes intragéniques, des fragments d'ADN internes au gène linA', tels qu'obtenus par action de  
25 l'exonucléase BAL31 sur le fragment HindIII-ClaI de 1,4kb purifié, défini ci-dessus.

Une sonde spécifique du gène linA' renferme une séquence de nucléotides allant des positions 645 à 735.

Une sonde hybride avec le gène linA et le gène linA' renferme une séquence de nucléotides allant des positions 789 à 966.

35 Ces fragments intragéniques sont avantageusement

- 8 -

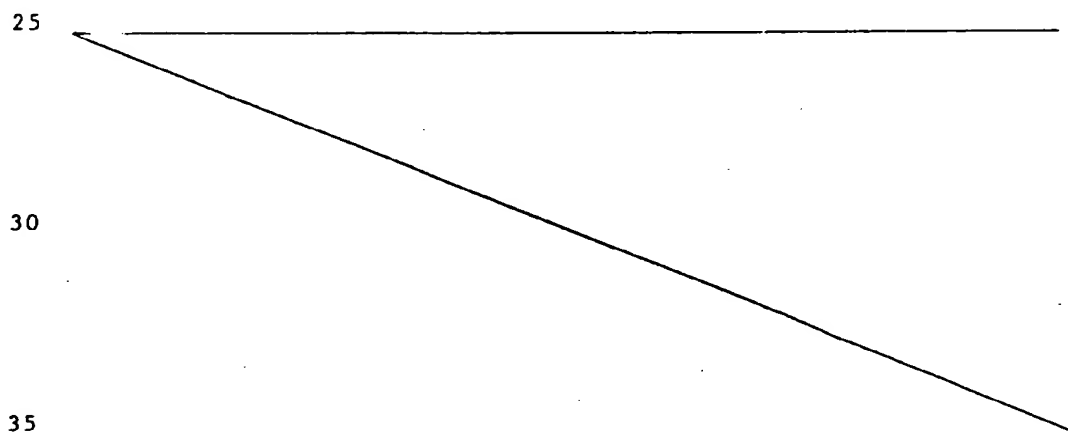
utilisés comme sondes pour l'étude de la dissémination de la résistance aux lincosamides.

L'invention vise également les applications immunologiques de la protéine codée, plus spécialement  
5 pour l'élaboration d'antisérum spécifique ainsi que d'anticorps monoclonaux. Ces anticorps polyclonaux sont formés selon les techniques classiques par injection de la protéine à des animaux, récupération des antisérums, puis des anticorps à partir des antisérums par exemple  
10 par chromatographie d'affinité.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention sont rapportés dans la description qui suit concernant le clonage du gène linA' chez E.coli, la détermination de sa séquence nucléotidique et l'analyse  
15 des produits d'expression. Dans cette description, il sera fait référence aux figures 1 et 2.

- la figure 1 représentant la construction des plasmides pAT23 et pAT24, et  
- la figure 2, la séquence nucléotidique exprimant le  
20 gène linA'.

Les références bibliographiques mentionnées dans ce qui suit sont données en fin de description.



Matériel et méthodesI Souches bactériennes.

5 Les origines et les propriétés des souches  
bactériennes utilisées sont résumées dans le tableau 1  
suivant (E.coli étant naturellement résistant aux  
macrolides, lincosamides et streptogramines, on utilise  
la souche d'E.coli DB10 qui est un mutant de perméation  
10 à ces antibiotiques (1).

TABLEAU 1

BACTERIE	SOUCHE	CARACTERES (a)
15 <u>Staphylococcus</u> <u>aureus</u>	BM4611	LnPnKm
<u>Escherichia coli</u>	DB10	Dérivé de PR7(F <sup>-</sup> 20 <u>thi leu rus pup</u> <u>nal-r</u> ) sensible aux MLS
25	K-12 JM101	( <u>lac-pro</u> ), <u>thr</u> , <u>supE</u> , F' <u>traD</u> 36, <u>proAB</u> +, <u>lacI</u> <sup>q</sup>
30	K-12 AR1062	<u>thr</u> , <u>leu</u> , <u>lac</u> , <u>gal</u> , <u>xyl</u> , <u>mal</u> , <u>mtl</u> , <u>hsdS</u>

(a) Les symboles génétiques sont d'après Bachmann et  
coll.(2) et Novick et coll.(3).

2. MILIEUX DE CULTURE

35 Les souches d'E.coli et de S.aureus sont cultivées en  
milieu coeur-cerveau (Difco) bouillon ou agar. On

réalise les antibiogrammes sur milieu de Mueller-Hinton-  
(Diagnostic Pasteur) agar avec des disques imprégnés  
d'antibiotiques (Diagnostics Pasteur). Toutes les  
incubations sont effectuées à 37°C.

### 5 3. TESTS DE GOTS(4)

Principe : si l'on cultive une souche productrice d'une  
enzyme inactivant l'antibiotique sur une gélose  
ensemencée avec une souche indicatrice et contenant une  
10 quantité d'antibiotique juste suffisante pour inhiber  
cette dernière, la production d'enzyme provoquera une  
dégradation de l'antibiotique dans le milieu de culture  
et se traduira par une croissance de la souche  
indicatrice autour de la souche productrice.

15 Les tests ont été réalisés sur milieu coeur-cerveau con-  
tenant la souche indicatrice Sarcina lutea ATCC 9341 et  
de la clindamycine (0,5 mg/l). Les incubations ont été  
faites à 30°C pendant 48 h.

### 20 4. PLASMIDES

Les plasmides utilisés dans ces travaux sont énumérées  
dans le tableau 2.

Tableau 2.

25	Plasmide	Caractères <u>phénotypiques(a)</u>	Origine
	pUC8	Tra <sup>-</sup> , Mob <sup>-</sup> , Ap	
	PIP856	Tra <sup>-</sup> , Cl, Ln	plasmide naturel
	pAT23	Tra <sup>-</sup> , Mob <sup>-</sup> , Ap Cl Ln Tc	pBR329 $\wedge$ pIP856 <u>EcoRI</u>
30			
	pAT 24	Tra <sup>-</sup> , Mob <sup>-</sup> , Ap Cl Ln	pUC8 $\wedge$ pIP856 <u>HindIII-ClaI</u> 1,4kb

35

(a) La nomenclature des caractères phénotypiques des  
plasmides est donnée d'après Novick et coll.(3).

## 5. PREPARATION DE L'ADN PLASMIDIQUE

5     . Préparation rapide : On effectue la caractérisation des plasmides recombinants obtenus après transformation après extraction de l'ADN plasmidique selon la technique de Birnboim et Doly (5) par digestion par endonucléases de restriction.

10    . Obtention d'ADN purifié : On extrait l'ADN plasmidique par la technique de lyse alcaline (6) puis on purifie par centrifugation à l'équilibre en gradient de chlorure de césium-bromure d'éthidium.

## 15    6. METHODES D'ANALYSE DES ADN.

a- Coupure par endonucléases de restriction :

20    L'arrêt de la réaction enzymatique est effectué par dénaturation thermique ou par extraction au phénol selon les enzymes.

b- Electrophorèse analytique ou préparative :

25    Les électrophorèses analytiques et préparatives sont réalisées en gels d'agarose à 0,8% immergés dans du tampon Tris-borate-EDTA (Tris base 45mM, acide borique 45mM, EDTA 1,25mM) en présence de bromure d'éthidium (0,5mg/l).

30    Les fragments d'ADN sont purifiés par électrotransfert sur une membrane de dialyse.

## 7. EXPRESSION DANS DES MINICELLULES D'E.COLI

35    La souche d'E.coli AR1062 (7) est transformée avec l'ADN des plasmides à étudier et cultivée une nuit sur milieu



- 12 -

coeur-cerveau. Les minicellules sont purifiées par centrifugation en gradient de sucrose. Les protéines synthétisées dans les minicellules sont marquées radioactivement par incorporation de ( $^{35}\text{S}$ )-méthionine. Leur masse moléculaire est déterminée par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 12,5% en présence de dodécyl-sulfate de sodium (SDS).

#### 8. SEQUENCAGE DE L'ADN

Les fragments d'ADN à séquencer sont clonés dans les formes répliquatives des bactériophages M13mp18, M13mp19 ou M13mp10 et introduits par transformation dans la souche d'*E. coli* JM101. Les bactériophages recombinants sont isolés sur gélose molle coeur-cerveau en présence d'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (80 mg/l) et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (40mg/l). Les formes simple brin sont purifiées suivant le protocole décrit par Amersham.

La séquence est déterminée par la technique de terminaison de chaîne (8). Les fragments sont marqués radioactivement par incorporation d'( $\alpha^{32}\text{P}$ )-déoxy ATP. Les échantillons sont déposés sur des gels de polyacrylamide à 6 ou 8% de 0,35 mm d'épaisseur en tampon Tris-borate-EDTA (Tris base 90mM, acide borique 90mM, EDTA 2,5mM).

#### 9. ENZYMES ET REACTIFS

Les enzymes utilisées et l'( $\alpha^{32}\text{P}$ )-dATP proviennent d'Amersham, les phages M13mp18, mp19 et mp10 de PL-Biochemicals, les antibiotiques des Laboratoires suivants : ampicilline (Bristol), tétracycline (Pfizer), lincomycine et clindamycine (Upjohn).

EXEMPLE1. CLONAGE DU GENE DE RESISTANCE AUX LINCOSAMIDES CHEZ  
E.COLI

## a - Construction des plasmides pAT23 et pAT24

La construction de ces plasmides est illustrée  
sur la figure 1.

Les tailles des différents fragments sont indiquées en kilobases. Les flèches en pointillés symbolisent les gènes de résistance inactivés par le clonage.

Dans les plasmides, Ap désigne la résistance à l'ampicilline, Cm au chloramphénicol, Tc à la tétracycline et ORI l'origine de réplication.

On procède comme suit :

## A/ Construction du plasmide pAT22 :

On soumet les plasmides pBR329 de 4,1kb et pIP855 de 2,5kb à une étape de digestion par EcoRI puis de ligation.

On obtient le plasmide pAT22.

## B/ Construction du plasmide pAT23 :

On soumet les plasmides pBR329 de 4,1kb et pIP856 de 2,6kb à une étape de digestion par HindIII, puis de ligation. On obtient le plasmide pAT23.

## C/ Construction du plasmide pAT24 :

L'insertion HindIII de 2,6kb du plasmide pAT23 a été purifiée, digérée par l'enzyme de restriction ClaI et les fragments obtenus ont été clonés dans le plasmide pUC8 (2,7kb) digéré par les enzymes AccI et HindIII. Le plasmide recombinant pAT24 obtenu contient un fragment ClaI-HindIII de 1,4kb (fig. 1) conférant la résistance aux lincosamides, par inactivation.

Le fragment de 1,4kb est purifié pour séquençage à partir de pAT24. A cet effet, on soumet pAT24 à une digestion par les enzymes EcoRI et HindIII.

Les clonages sont effectués dans E.coli DB10 en

sélectionnant pour la résistance à l'ampicilline (100g/l) et la clindamycine (1g/l) et en vérifiant le phénotype Gots positif des transformants obtenus. Les constructions plasmidiques sont vérifiées par digestion par les endonucléases de restriction appropriées.

5    2. SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE DU FRAGMENT DE 1,4KB

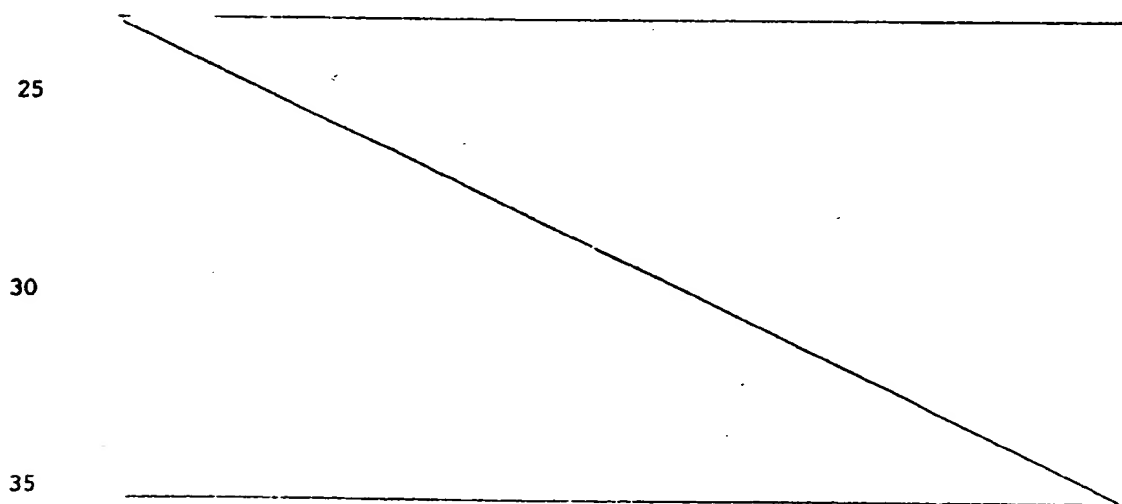
    a - Sous-clonage dans le bactériophage M13.

        Stratégie de séquence.

        Le fragment HindIII-EcoRI de 1,4kb purifié est digéré par les endonucléases de restriction, AluI, RsaI,  
10    Sau3A, DraI et TaqI ainsi que par l'exonucléase Ba<sub>2</sub>31, et les fragments obtenus sont clonés dans les formes répliquatives de bactériophages M13mp18, mp19 et mp10. Les bactériophages recombinants ainsi obtenus permettent d'obtenir la totalité de la séquence du fragment de  
15    1,4kb.

        La séquence nucléotidique complète du fragment d'ADN HindIII-ClaI de 1420pb de pIP856 contenant le gène de résistance aux lincosamides est présentée sur la figure 2.

20    La numérotation commence au site HindIII. La séquence d'acides-amino de la protéine et le site de fixation du ribosome sont indiqués.



5

Les références bibliographiques dont question  
ci-dessus sont les suivantes :

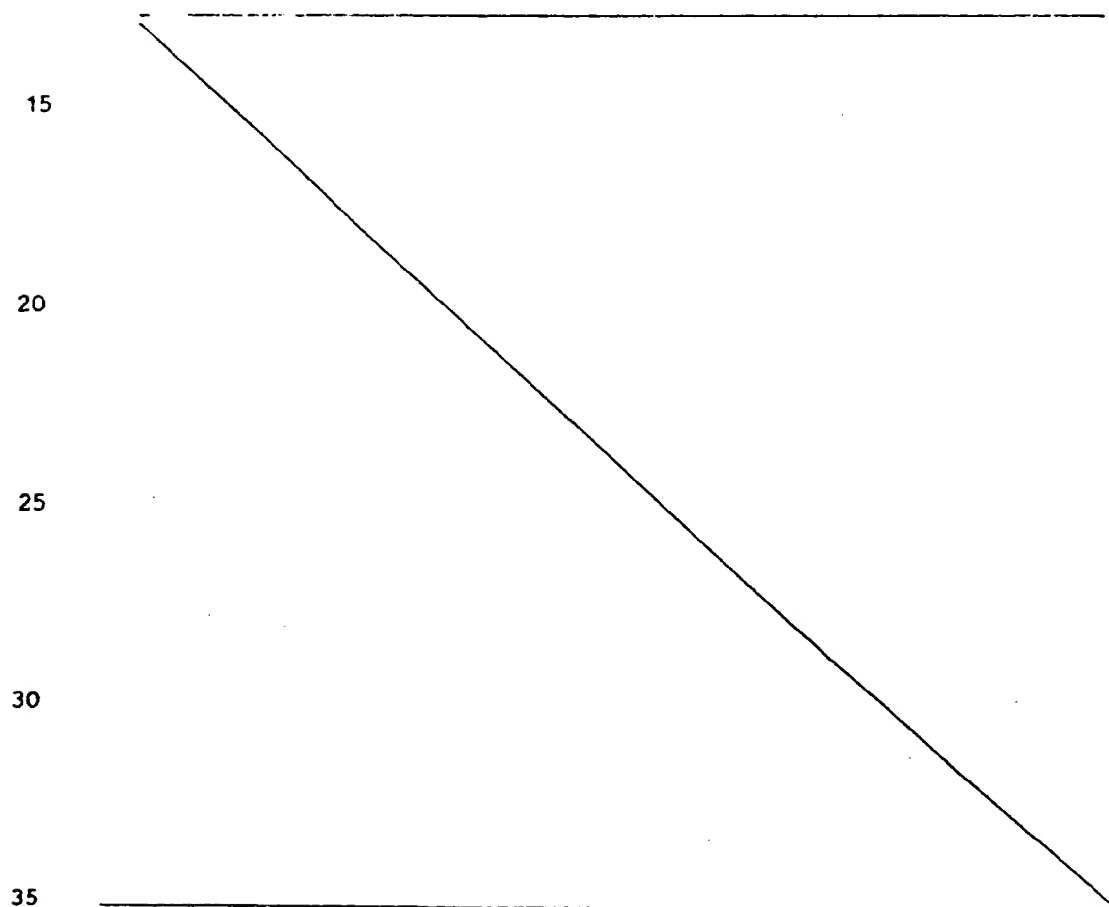
- 1- DATTA, N., W. HEDGES, D. BECKER, and J. DAVIES. 1974. Plasmid-determined fusidic acid resistance in the Enterobacteriaceae. J. Gen. Microbiol. 83:191-196.
- 2- BACHMANN, B. J. 1983. Linkage map of Escherichia coli K12. Edition 7. Microbiol. Rev. 47:180-230.
- 3- NOVICK, R. P., R. C. CLOWES, S. N. COHEN, R. CURTISS, N. DATTA, and S. FALKOW. 1976. Uniform nomenclature for bacterial plasmids : a proposal. Bacterial. Rev. 40:168-189.
- 4- GOTS, J. S. 1945. The detection of penicillinase-producing properties of microorganisms. Science 102:309.
5. BIRNBOIM, H. C. and J. DOLY 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7:1513-1523.
6. MANIATIS, T., E. F. FRITSCH and J. SAMBROOK. 1982. In Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Inc., New York.
7. RAMBACH, A. and D. S. HOGNESS. 1977. Translation of Drosophila melanogaster sequences in Escherichia coli Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5041-5045.
8. SANGER, F. S. NICKLEN, and A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74:5463-5467.
9. MORAN, C. P., N. LANG, S. J. LEGRICE, G. LEE, M. STEPHENS, A. L. SONENSHEIN, J. PERO and R. LOSIK. 1982. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet. 186:339-346.

10. STORMO, D.G., T.G. SCHNEIDER. and L.M. GOLD. 1982  
Characterization of translational initiation sites in  
E.coli Nucl. Acids Res. 10:2971-2996..

11. LECLERCQ, R., C. CARLIER, J. DUVAL and P. COURVALIN  
5 1985. Plasmidmediated resistance to lincomycin by  
inactivation in Staphylococcus. Antimicrob. Agents  
Chemother.

12. ROSENBERG, M. and D. COURT. 1979. Regulatory  
sequences involved in the promotion and termination of  
10 RNA transcription. Annu. Rev. Genet. 13:319-353.

13. HU and MESSING - Elsevier Biomedical press. gene  
17 (1982) : 271-272.



- 17 -

REVENDICATIONS

1. Sonde de détection d'une résistance aux lincosamides selon la revendication 7 de la demande de brevet principal 85/14397 du 27/9/1985, caractérisée en ce qu'elle renferme un fragment d'ADN du gène linA dont la séquence est la suivante :

10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35

ATG AAA ATT GAT AAT GTA 662

ACA GAA AAG GAT TTA TTT TAT ATT TTA GAC TTA TTT GAA AAA ATG GAA GTA ACT CAT TGG 722

TTA GAT GGA GGC TGG GGC GTA GAT GTA TTA ACT GGA AAA CAA CAA AGA GAA CAC AGA GAT 782

ATA SAT ATA BAT TTT GAC GCT CAA CAC ACT CAA AAA BTT ATA AAA AAA TTA GAA GAT ATA 842

GGA TAC AAA ATA GAA GTT GAT TGG ATG CCT TCA CGT ATG GAA CTT AAA CAT AAA GAA TAT 902

GGA TAT TTA GAT ATT CAT CCT ATA AAT TTA AAT GAT GAT GGT TCC ATT ACT CAA GCA AAC 962

CCA GAA GGT GGC AAT TAC ATC TTT CAA AAT GAA TGG TTT TCA GAA ACT AAT TAT AAA GGT 1022

GGA AAA ATA CCA TGC ATT TCC AAA GAA GCT CAA CTT CTT TTT CAT TCC GGT TAT GAA TTA 1082

ACA GAA AAA GAC CAT TTT GAT ATA AAA AAT TTA AAA TCA ATA ACT

- 18 -

2. Fragment d'ADN, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique suivante nécessaire pour l'expression du gène linA:

5  
 AAGCTTTAGA CATATGCTTT AAGCTCTCTT CTAAGTGTTC 40  
 ACCGTCTATT GCATTTCTAG TCGACAAAGT TAGGAATAAC CAACSAGAAG TAGGTTTTTC TTAAACCACT 110  
 TCTTCAATCA CTTTTTGAGC TTGATAACTA TTTTTCATAG CACGCTCCA ATTACAGACC GGACATAATT 180  
 TAGATTTACA AAACCATGTC TTATGTAAGT TCAAAATATCC TTCATCAGTC GGCTTGAAGT CTAAGACGTT 250  
 10 TCCACATTGT TTTACSTTAT AAGCCTTTTT TATTTTTAGT ATTTCAAGTA TATCTGCATA GCCTACATTA 320  
 TCTATTTTCT TTCTCTCCAT GGGCGTGTTC CCACTTTTGT CATATCTTTA ATGTTTCTTT ATCTTGATTT 390  
 TCGTCTATAT ATTTTGATG ATTGTCTTGC ATATAAAAG ACCTGCCAGT ATTAAGTTGA TGAGTAGATG 460  
 TTTCANTCTT GATTACTGGA CTTTTTTATG TCAAAATTTT CTTTCACSCA TAAAATACA TAAACACACT 530  
 AGTCATATCA CSTTAATATG ATGTTTAATA TCTTTGAGTT ATTTCTATAT AGTATCAAGA CAASAGBAAA 600  
 15 CTCGTTTTCA ACTCGTTTCA AATTCCTAAA <sup>RBS</sup> TTAGGAGGGG TAAA ATG AAA ATT SAT AAT GTA 662  
 ACA GAA AAG SAT TTA TTT TAT ATT TTA GAC TTA TTT GAA AAA ATG SAA GTA ACT CAT TGG 722  
 TTA SAT GSA GGC TGG GGC STA SAT STA TTA ACT GGA AAA CAA CAA ASA SAA CAC AGA GAT 782  
 20 ATA GAT ATA BAT TTT GAC GCT CAA CAC ACT CAA AAA GTT ATA AAA AAA TTA SAA SAT ATA 842  
 GGA TAC AAA ATA SAA GTT SAT TGG ATG CCT TCA CGT ATG SAA CTT AAA CAT AAA GAA TAT 902  
 GGA TAT TTA SAT ATT CAT CCT ATA AAT TTA AAT GAT GAT GGT TCC ATT ACT CAA GCA AAC 962  
 CCA GAA GGT GGC AAT TAC ATC TTT CAA AAT SAA TGG TTT TCA SAA ACT AAT TAT AAA GAT 1022  
 25 CCA AAA ATA CCA TGC ATT TCC AAA SAA GCT CAA CTT CTT TTT CAT TCC GGT TAT SAA TTA 1082  
 ACA GAA AAA GAC CAT TTT BAT ATA AAA AAT TTA AAA TCA ATA ACT TAA TT TCTTTATTC 1142  
 AATTGCTTTA TTCCAATTGC TTTATTCCAA TTGCTTTATT GACGTTGAGC CTCGSAACCC TTAACGATCC 1202  
 CAAAACCTTG CCAATGGTGG GCTTAATAGC TCACGCTATG CCSACATTGG TCTGCAAGTT TAGTTAAGGG 1262  
 30 TTCGTCTCAA CGACAATAA TTTCTGCGAT AAATGCTGT TCTATTTTTT ATTTTACTC CTTTGATAG 1322  
 CAAAAAACGC CATTCCAATA CAAAACCACA TACCTATAAT CGAT 1448

35

- 19 -

3. Fragment d'ADN selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une partie du gène linA', ce gène codant pour une protéine capable d'inactiver les lincosamides et étant inclus dans la séquence nucléotidique suivante :

5

ATG AAA ATT GAT AAT GTA 662

ACA GAA AAG GAT TTA TTT TAT ATT TTA GAC TTA TTT GAA AAA ATG GAA GTA ACT CAT TGG 722

10 TTA GAT GGA GGC TGG GGC GTA GAT GTA TTA ACT GGA AAA CAA CAA AGA GAA CAC AGA GAT 782

ATA GAT ATA GAT TTT GAC GCT CAA CAC ACT CAA AAA GTT ATA AAA AAA TTA GAA GAT ATA 842

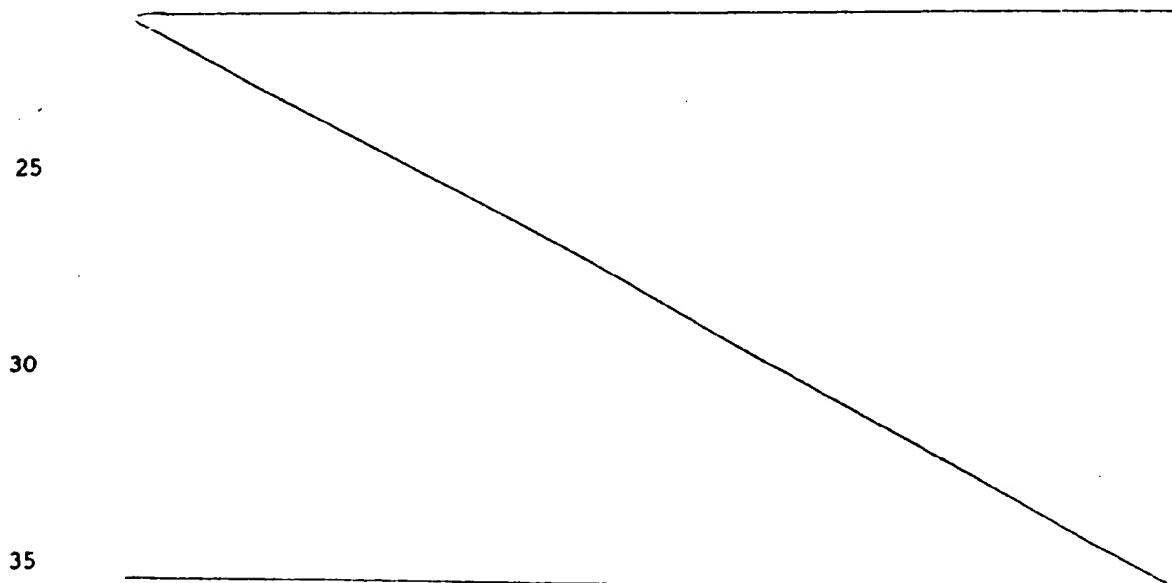
GGA TAC AAA ATA GAA GTT GAT TGG ATG CCT TCA CGT ATG GAA CTT AAA CAT AAA GAA TAT 902

15 GGA TAT TTA GAT ATT CAT CCT ATA AAT TTA AAT GAT GAT GGT TCC ATT ACT CAA GCA AAC 962

CCA GAA GGT GGC AAT TAC ATC TTT CAA AAT GAA TGG TTT TCA GAA ACT AAT TAT AAA GGT 1022

CGA AAA ATA CCA TGC ATT TCC AAA GAA GCT CAA CTT CTT TTT CAT TCC GGT TAT GAA TTA 1082

20 ACA GAA AAA GAC CAT TTT GAT ATA AAA AAT TTA AAA TCA ATA ACT





4. Fragment d'ADN selon la revendication 2, caractérisé en ce que la séquence codante du gène linA est définie par un codon d'initiation ATG en position 645 et un codon de terminaison TAA en position 1127 dans une phase ouverte de lecture de 483 pb et qu'elle présente  
5 une homologie de 449 sur 483 pb soit 93% avec le gène linA.

5. Fragment d'ADN selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce qu'il est présent dans le plasmide naturel pI856 de 2,6 kilobases, chez  
10 Staphylococcus aureus BM4611, ce plasmide codant pour la résistance à la lincomycine et contenant un site unique HindIII.

6. Fragment d'ADN, selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce qu'il est porté  
15 par un fragment d'ADN de restriction de 1,4kb tel qu'obtenu par digestion de l'ADN plasmidique de pIP856 par les enzymes de restriction ClaI et HindIII, clonage des fragments obtenus dans le plasmide pUC8 de 2,7kb digéré par les enzymes AccI et HindIII.

7. Fragment d'ADN selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisé en ce qu'il code pour  
20 une protéine de résistance aux lincosamides ayant une masse moléculaire apparente de l'ordre de 19000 daltons.

8. Vecteur recombinant comportant au moins une  
25 partie à un fragment d'ADN selon l'une quelconque des revendications 2 à 7.

9. Plasmide pAT24 construit en clonant dans le plasmide pUC8 de 2,7kb digéré par les enzymes AccI et HindIII, les fragments obtenus par digestion par des  
30 enzymes de restriction appropriés, de 2,6kb, du plasmide pAT23, ce plasmide recombinant résultant lui-même de la linéarisation du plasmide pIP856 par HindIII et de son clonage dans le site HindIII de pBR329.

10. Procédé d'obtention de la séquence nucléotidique du gène linA', caractérisé en ce qu'il comprend :

- le clonage du déterminant de résistance aux lincosamides,
- 5 - la purification du fragment de 1,4kb, par digestion avec les enzymes de restriction appropriés d'un plasmide renfermant la séquence du gène linA', tel que pIP856, pAT23 ou pAT24,
- le sous-clonage de fragments de restriction dérivés de ce fragment de 1,4kb dans les formes répliquatives des phages M13mp10, mp18 et mp19.

11. Polypeptide de 19000 à 21000 daltons environ, capable d'inactiver les lincosamides et de conférer des propriétés de résistance à la lincomycine, caractérisé en ce qu'il répond à la séquence suivante d'acides aminés.

		Met Lys Ile Asp Asn Val	662
20	Thr Glu Lys Asp Leu Phe Tyr Ile Leu Asp Leu Phe Glu Lys Met Glu Val Thr His Trp		722
	Leu Asp Gly Gly Trp Gly Val Asp Val Leu Thr Gly Lys Gln Gln Arg Glu His Arg Asp		782
	Ile Asp Ile Asp Phe Asp Ala Gln His Thr Gln Lys Val Ile Lys Lys Leu Glu Asp Ile		842
25	Gly Tyr Lys Ile Glu Val Asp Trp Met Pro Ser Arg Met Glu Leu Lys His Lys Glu Tyr		902
	Gly Tyr Leu Asp Ile His Pro Ile Asn Leu Asn Asp Asp Gly Ser001a Thr Gln Ala Asn		962
	Pro Glu Gly Gly Asn Tyr Ile Phe Gln Asn Glu Trp Phe Ser Glu Thr Asn Tyr Lys Gly		1022
30	Arg Lys Ile Pro Cys Ile Ser Lys Glu Ala Gln Leu Leu Phe His Ser Gly Tyr Glu Leu		1082
	Thr Glu Lys Asp His Phe Asp Ile Lys Asn Leu Lys Ser Ile Thr 000		

12. Utilisation du fragment d'ADN selon la revendication 2 comme marqueur de résistance de vecteurs de clonage.

5

10

15

20

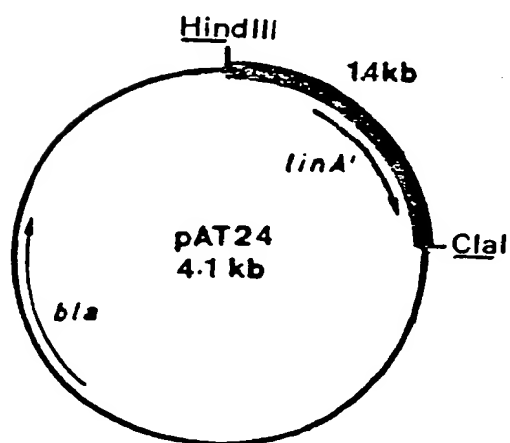
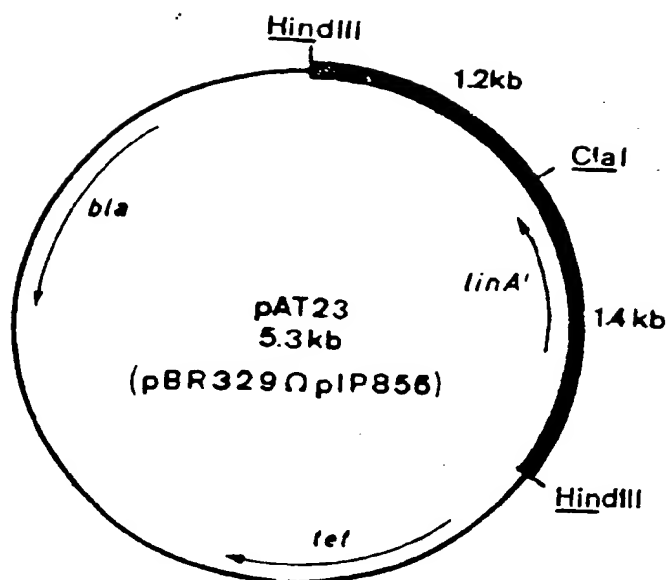
25

30

35

1/2

Figure 1



2/2

Figure 2

HindIII

AACCTTTAGA CATATGCTTT AAGCTCTCTT CTAATGTTT	40
ACCBCTCTATT GCATTTCTAG TCGACAAAGT TAGGAATAAC CAACGAGAAG TAGGTTTTTC TTTAACCCT	110
TCTTCAATCA CTTTTTGAGC TTGATAACTA TTTTTCATAG CACGCCTCCA ATTACAGACC GGACATAATT	180
TAGATTTACA AAACCATGTC TTATGTAAT TCAAATATCC TTCATCAGTC GGCTTGAAT CTAAGACGTT	250
TCCACATTGT TTTACGTTAT AAGCCTTTTT TATTTTATG ATTTCAAGTA TATCTGCATA GCCTACATTA	320
TCTATTTTCT TTCTCTCCAT GGGCGTGTTC CCACTTTTGT CATATCTTTA ATGTTTCGTT ATCTTGATTT	390
TGCTCTATAT ATTTTGTATG ATTGCTTTC ATATAAAAG ACCTGCCAGT ATTAAGTTGA TGASTAGATG	460
TTTCAATCTT GATTACTGGA CTTTTTTATG TCAAATTTTC CTTTCACGCA TAAAAATACA TAAAAACCT	530
AGTCATATCA CGTTAATATG ATGTTTAATA TCTTTGAGTT ATTTCTATAT AGTATCAAGA CAAGAASAAA	600
CTCGTTTTCA ACTCGTTTCA AATTCCTAAA TTAGSAGGGG TAAA	662
Met Lys Ile Asp Asn Val ATG AAA ATT GAT AAT GTA	
Thr Glu Lys Asp Leu Phe Tyr Ile Leu Asp Leu Phe Glu Lys Met Glu Val Thr His Trp ACA GAA AAG GAT TTA TTT TAT ATT TTA GAC TTA TTT GAA AAA ATG GAA GTA ACT CAT TGG	722
Leu Asp Gly Gly Trp Gly Val Asp Val Leu Thr Gly Lys Gln Gln Arg Glu His Arg Asp TTA GAT GGA GGC TGG GGC GTA GAT GTA TTA ACT GGA AAA CAA CAA AGA GAA CAC AGA GAT	782
Ile Asp Ile Asp Phe Asp Ala Gln His Thr Gln Lys Val Ile Lys Lys Leu Glu Asp Ile ATA GAT ATA GAT TTT GAC GCT CAA CAC ACT CAA AAA GTT ATA AAA AAA TTA GAA GAT ATA	842
Gly Tyr Lys Ile Glu Val Asp Trp Met Pro Ser Arg Met Glu Leu Lys His Lys Glu Tyr GGA TAC AAA ATA GAA GTT GAT TGG ATG CCT TCA CGT ATG GAA CTT AAA CAT AAA GAA TAT	902
Gly Tyr Leu Asp Ile His Pro Ile Asn Leu Asn Asp Asp Gly Ser00le Thr Gln Ala Asn GGA TAT TTA GAT ATT CAT CCT ATA AAT TTA AAT GAT GAT GGT TCC ATT ACT CAA GCA AAC	962
Pro Glu Gly Gly Asn Tyr Ile Phe Gln Asn Glu Trp Phe Ser Glu Thr Asn Tyr Lys Gly CCA GAA GGT GGC AAT TAC ATC TTT CAA AAT GAA TGG TTT TCA GAA ACT AAT TAT AAA GGT	1022
Arg Lys Ile Pro Cys Ile Ser Lys Glu Ala Gln Leu Leu Phe His Ser Gly Tyr Glu Leu CGA AAA ATA CCA TGC ATT TCC AAA GAA GCT CAA CTT CTT TTT CAT TCC GGT TAT GAA TTA	1082
Thr Glu Lys Asp His Phe Asp Ile Lys Asn Leu Lys Ser Ile Thr *** ACA GAA AAA GAC CAT TTT GAT ATA AAA AAT TTA AAA TCA ATA ACT TAA TT TCTTTATTCC	1142
AATTGCTTTA TTCCAATTGC TTTATTCCAA TTGCTTTATT GACGTTGAGC CTCCGAACCC TTAACGATCC	1212
CAAACTTGC CGAATGGTGC GCTTAATAGC TCACGCTATG CCGACATTCG TCTGCAAGTT TAGTTAGGG	1282
TTGCTCTCAA CGCACAATAA TTTCTCGCAT AAATGCGTGT TCTATTTTTT ATTTTACTC CTCTTGATAG	1352
CAAAAAACSC CATTCCAATA CAAACCACA TACCTATAAT CGAT	

Clal

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)